

ẢNH HƯỞNG CỦA ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY HUYỀN PHÙ LÊN SINH TRƯỞNG VÀ TÍCH LŨY SAPONIN Rb1 TRONG TẾ BÀO CÂY GIẢO CỔ LAM (*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino).

Trần Thị Ngọc Ánh^{1,2}, Phạm Thị Diễm Thi¹, Trần Thúy Lan¹, Trần Quốc Dung³, Nguyễn Quang Hoàng Vũ¹, Trương Thị Bích Phượng², Hoàng Tấn Quảng^{1*}

¹ Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế

² Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

³ Trường Đại học Sư phạm, Đại học Huế

TÓM TẮT

Giảo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino) phân bố chủ yếu ở một số tỉnh miền núi bao gồm Lào Cai (Sa Pa), Hà Giang, Cao Bằng, Lạng Sơn, Quảng Ninh, Hòa Bình. Đây là cây thân thảo lâu năm thuộc họ bầu bí, chứa một số hợp chất như saponin, flavonoid, polysaccharide, vitamin và các amino acid rất có ích cho sức khỏe. Trong dân gian Giảo cổ lam được sử dụng như là một cây thuốc để chữa một số bệnh như là cao huyết áp, viêm phế quản mãn tính, đau dạ dày mãn tính. Trong nghiên cứu này, callus của cây Giảo cổ lam được sử dụng làm nguyên liệu cho nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy lên sinh trưởng và tích lũy saponin Rb1 trong tế bào huyền phù. Nuôi cấy tế bào trên môi trường MS có bổ sung 3,0% sucrose, 2,0 mg/L KIN và 0,5 mg/L IBA với các cỡ mẫu nuôi cấy ban đầu: 2 - 4 g tế bào, tốc độ lắc: 100 - 150 vòng/phút thời gian nuôi cấy: 10 - 24 ngày. Kết quả nghiên cứu cho thấy, môi trường MS có bổ sung 2,0 mg/L KIN và 0,5 mg/L IBA; với cỡ mẫu nuôi cấy là 3 g tế bào callus, tốc độ lắc 120 vòng/phút là thích hợp cho sinh trưởng của tế bào. Sinh khối tế bào đạt cao nhất là 5,37 g khối lượng tươi (0,29 g khối lượng khô); chỉ số sinh trưởng là 1,79 sau 20 ngày nuôi cấy. Khả năng tích lũy saponin Rb1 cao nhất sau 18 ngày nuôi cấy, với diện tích peak là 51,312 mAU².

Từ khóa: *Gynostemma pentaphyllum*, saponin Rb1, tế bào huyền phù, tốc độ lắc.

MỞ ĐẦU

Giảo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino) hay còn gọi là Cổ yếm, Thư trảng năm lá, dây lữa hùng, trường sinh thảo hoặc thất diệp đảm, ngũ diệp sâm; thuộc họ Bầu bí (Cucurbitaceae). Cây mọc ở độ cao 200 - 2.000 m, trong các rừng thưa và ẩm ở Trung Quốc, Nhật Bản, Ấn Độ, Indonesia, Triều Tiên và một số nước châu Á khác trong đó có Việt Nam (Chen *et al.*, 2000). Giảo cổ lam còn được sử dụng như là một vị thuốc được sử dụng từ lâu đời ở nhiều nước châu Á với công dụng tăng cường sức khỏe và tuổi thọ.

Nhiều báo cáo khoa học chứng minh thành phần chính của Giảo cổ lam là flavonoid và saponin, với tác dụng hạ đường huyết, chống oxy hóa bảo vệ tế bào gan, giảm cholesterol và triglycerol trong máu,... trong đó saponin được cho là thành phần có tác dụng sinh học chủ yếu này (được gọi là gypenoside). Một số saponin có cấu trúc hóa học giống như cấu trúc có trong nhân sâm (ginsenoside) (Bùi Đình Lâm *et al.*, 2015). Đã có trên 100 saponin trong thành cây Giảo cổ lam được phân lập và nhận dạng cấu trúc, trong đó có 8 saponin giống như loại protopanaxadiol trong ginsenoside của cây *Panax ginseng* là Rb1 (Gypenoside III), Rc, Rb3 (Gypenoside IV), Rd (Gypenoside VIII), F2, Rg3, malonyl-Rb1 và malonyl-Rd (Ma *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 2008). Do có thành phần và tác dụng gần giống với nhân sâm nhưng giá thành rẻ hơn, hiện nay đã có các sản phẩm thuốc, trà và thực phẩm chức năng có thành phần chứa Giảo cổ lam.

Hiện nay, Giảo cổ lam chủ yếu được khai thác tự nhiên, mặc dù nhu cầu về loài dược liệu này khá cao nhưng nguồn Giảo cổ lam trong tự nhiên rất hạn chế, khó tìm và hầu như trên bờ cạn kiệt. Vì vậy, việc nghiên cứu để tạo ra nguồn nguyên liệu thay thế cây Giảo cổ lam tự nhiên là cần thiết, một trong các phương pháp có hiệu quả là nuôi cấy tế bào loài cây này. Nuôi cấy tế bào huyền phù có nhiều lợi thế hơn so với khai thác cây tự nhiên như sản xuất các hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học cao, chủ động trong cung cấp nguyên liệu, không bị nhiễm bẩn bởi thuốc trừ sâu, thuốc diệt cỏ, cần ít diện tích sản xuất... (Nguyễn Hoàng Lộc, 2011).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá ảnh hưởng của các điều kiện nuôi cấy lên quá trình sinh trưởng và tích lũy Rb1 của tế bào Giảo cổ lam nuôi cấy huyền phù.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu là callus cây Giảo cổ lam do Phòng thí nghiệm công nghệ Gen, Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế cung cấp.

Phương pháp nghiên cứu

Nuôi cấy callus

Callus được nuôi cấy trên môi trường MS (Murashige, Skoog, 1962) cơ bản có bổ sung 3% sucrose, 2,0 mg/L KIN và 0,5 mg/L IBA. Môi trường được điều chỉnh về pH 5,8 và được hấp khử trùng ở 121°C trong thời gian 15 phút.

Tất cả các thí nghiệm nuôi cấy được tiến hành trong phòng nuôi cấy mô tế bào thực vật, nhiệt độ phòng nuôi 25 ± 2°C, thời gian nuôi cấy chiếu sáng 16 giờ sáng/ngày, cường độ chiếu sáng 1.000 - 1.500 lux.

Nuôi cấy huyền phù tế bào

Tế bào huyền phù được nuôi trong các bình tam giác 250 mL chứa 50 mL môi trường lỏng có thành phần giống như môi trường nuôi cấy callus (không có agar).

Callus (30 ngày tuổi) được cấy chuyển vào bình tam giác với cỡ mẫu ban đầu là 3 g và tốc độ lắc là 120 vòng/phút trong khoảng thời gian từ 10 đến 24 ngày nuôi cấy để xây dựng đường cong sinh trưởng của tế bào. Các tiêu chí được sử dụng để đánh giá khả năng sinh trưởng của tế bào huyền phù bao gồm khối lượng tươi, khối lượng khô, chỉ số sinh trưởng và hàm lượng Rb1.

Để khảo sát các yếu tố của điều kiện nuôi cấy, callus (30 ngày tuổi) được cấy chuyển vào bình tam giác với các cỡ mẫu ban đầu khác nhau (2, 3, và 4 g tế bào) và tốc độ lắc khác nhau (100, 120 và 150 vòng/phút). Mẫu được thu vào thời gian đạt sinh trưởng và tích lũy Rb1 cực đại, các chỉ tiêu được đánh giá như ở thí nghiệm thời gian nuôi cấy.

Sinh khối tế bào được thu sau mỗi 2 ngày nuôi cấy để xác định khối lượng tươi và khối lượng khô. Tế bào được lọc và rửa sạch môi trường với nước cất bằng hệ thống lọc chân không, cân để xác định trọng lượng tươi. Tế bào sau đó được sấy ở 50°C đến trọng lượng không đổi, cân để xác định trọng lượng khô. Chỉ số sinh trưởng (GI-growth index) của tế bào được xác định bởi công thức: $GI = FWF/FWi$, trong đó FWF và FWi là khối lượng tươi của tế bào tại thời điểm đánh giá và thời điểm bắt đầu nuôi cấy (Nhan, Loc, 2018).

Xác định hàm lượng saponin Rb1

Tế bào cây Giảo cổ lam (5 g khô) được chiết trong 50 mL methanol 80% có sử dụng siêu âm, thời gian 1,5 giờ sau đó để bay hơi đến khô. Tiểu thể được cân và tái hòa tan trong methanol đến nồng độ khoảng 5 mg/mL, lọc qua màng lọc 0,22 µm sau đó bảo quản ở 4°C cho các thí nghiệm tiếp theo (Wu *et al.*, 2014). Phân tích HPLC được sử dụng để định lượng các thành phần trong dịch chiết. HPLC được thực hiện trên cột C18 (4,6 mm × 250 mm × 5 mm). Pha động bao gồm nước và acetonitrile (34%) trong thời gian đến 70 phút, nhiệt độ chạy 30°C, tốc độ dòng 0,8 mL/phút, thể tích chạy 20 µL. Tín hiệu được thu nhận bằng đầu dò ở bước sóng 203 nm (Liu *et al.*, 2008). Chất chuẩn được sử dụng trong phân tích HPLC là ginsenoside Rb1 (Sigma), hàm lượng Rb1 được xác định dựa trên diện tích của peak có thời gian lưu trùng với peak chuẩn.

Xử lý số liệu

Các thí nghiệm được bố trí 3 lần lặp lại. Kết quả thí nghiệm được tính trung bình và phân tích ANOVA với Duncan's test ($p < 0,05$) bằng phần mềm SPSS 19.0.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng thời gian nuôi cấy lên sự sinh trưởng và tích lũy Rb1 trong tế bào Giảo cổ lam nuôi cấy huyền phù

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy lên sinh trưởng của tế bào huyền phù cây Giảo cổ lam được trình bày ở bảng 1 và hình 1. Qua kết quả thu được ở bảng 1 cho thấy sinh khối tế bào tăng liên tục từ 10 ngày đến 20 ngày nuôi cấy, sinh khối cao nhất đạt 5,37 g tươi/bình, tương ứng với 0,29 g khô/bình với chỉ số sinh trưởng là 1,79 sau 20 ngày nuôi cấy (Hình 1). Sau khi đạt đỉnh, cây sinh khối tế bào giảm liên tục, đến ngày thứ 24 chỉ thu được 4,47 g tươi, 0,18 g khô với chỉ số sinh trưởng là 1,49.

Kết quả phân tích HPLC saponin tổng số cho thấy có tổng cộng 17 peak xuất hiện, có thời gian lưu từ 1,959 đến 11,600 phút (Hình 2). Trong đó, có 1 peak có thời gian lưu là 6,743 phút, tương đương với thời gian lưu của peak chuẩn Rb1 là 6,852 phút, đây chính là Rb1. Kết quả thể hiện ở hình 2 cũng cho thấy Rb1 chỉ chiếm một tỷ lệ rất nhỏ so với các hợp chất khác chứa trong tế bào Giảo cổ lam (có thời gian lưu nhỏ hơn 6 phút).

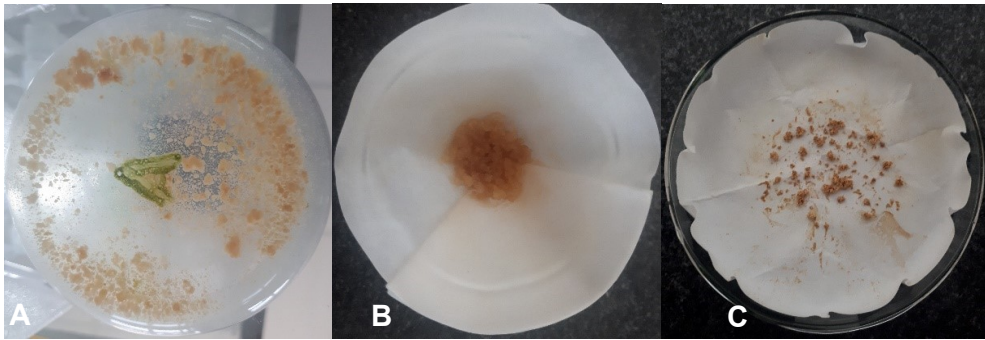
So với sinh trưởng của tế bào, sự tích lũy Rb1 trong tế bào Giảo cổ lam đạt cực đại sớm hơn. Khả năng tích lũy Rb1 trong tế bào tăng dần từ ngày thứ 10 đến ngày thứ 18, diện tích peak đạt cao nhất là 51,312 mAU² (Hình 2)

sau đó giảm mạnh từ ngày thứ 20 đến ngày thứ 24. Như vậy, có thể thấy nuôi cấy huyền phù tế bào *Giáo cổ lam* trên môi trường có bổ sung 3% sucrose, 2,0 mg/L KIN và 0,5 mg/L IBA với cỡ mẫu ban đầu là 3 g và tốc độ lắc là 120 vòng/phút thu được hàm lượng Rb1 cao nhất sau 18 ngày nuôi cấy.

Bảng 1. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy lên sự sinh trưởng và tích lũy Rb1 của tế bào *Giáo cổ lam* nuôi cấy huyền phù

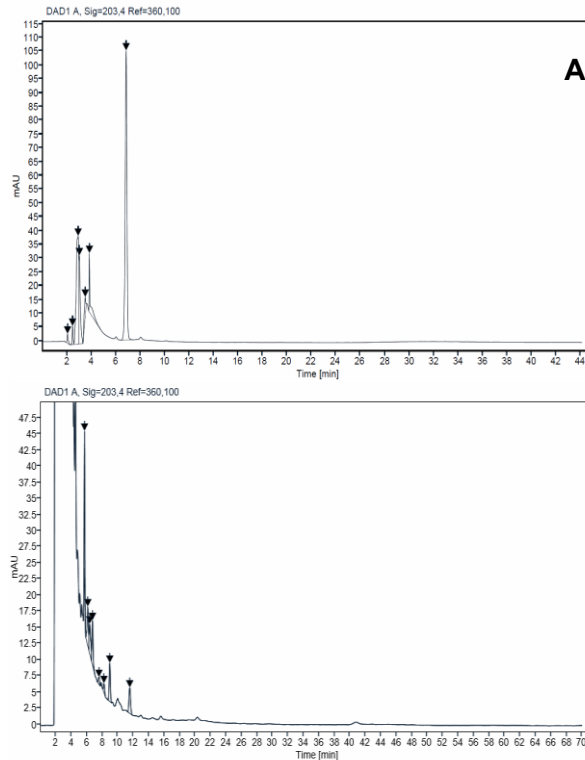
Thời gian nuôi cấy(ngày)	Fw (g/bình)	Dw (g/bình)	G _i	Rb1 (mAU ²)
10	3,48 ⁿ	0,17 ^g	1,16	19.529
12	3,82 ^g	0,18 ^f	1,32	21.376
14	4,24 ^f	0,19 ^e	1,41	25.423
16	4,66 ^d	0,22 ^d	1,55	35.342
18	4,93 ^c	0,24 ^b	1,64	51.312
20	5,37 ^a	0,29 ^a	1,79	32.509
22	5,17 ^b	0,23 ^c	1,72	26.527
24	4,47 ^e	0,18 ^f	1,49	25.418

Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở $p < 0,05$ (Duncan's test). Fw: khối lượng tươi (g); Dw: khối lượng khô (g); G_i: chỉ số sinh trưởng; Sp: diện tích peak.



Hình 1. Tế bào *Giáo cổ lam* trên môi trường MS có 2,0 mg/L KIN và 0,5 mg/L IBA sau 20 ngày nuôi cấy.

A. Tế bào *Giáo cổ lam* trong bình tam giác, B. Sinh khối tươi của tế bào *Giáo cổ lam*, C. Sinh khối khô của tế bào *Giáo cổ lam*



Hình 2. Phổ HPLC của saponin Rb1

A. mẫu chuẩn Rb1, B. tế bào huyền phù *Giáo cổ lam* sau 18 ngày nuôi cấy.

Ảnh hưởng của cỡ mẫu nuôi cấy lên sự sinh trưởng và tích lũy Rb1 của tế bào Giảo cổ lam nuôi cấy huyền phù

Tế bào với các cỡ mẫu ban đầu khác nhau (2-4 g tế bào) được nuôi cấy trên môi trường lỏng có thành phần giống như môi trường sinh trưởng tốt nhất của callus. Sự sinh trưởng của tế bào huyền phù sau 18-20 ngày nuôi cấy được trình bày ở bảng 2.

Kết quả được trình bày ở bảng 2 cho thấy, với cỡ mẫu 2 và 3 g, sinh khối tế bào ở ngày thứ 20 cao hơn ngày thứ 18, trong khi với cỡ mẫu 4 g cho kết quả ngược lại, sinh khối tế bào bắt đầu giảm sau ngày thứ 18. Như vậy, sinh khối tế bào Giảo cổ lam đạt giá trị cực đại rơi vào khoảng 18-20 ngày nuôi cấy, trong đó đạt cao nhất với cỡ mẫu nuôi cấy ban đầu là 3 g. Với cỡ mẫu nuôi cấy là 2 g, tuy có chỉ số sinh trưởng cao nhưng chất lượng dịch huyền phù tế bào có chất lượng không cao, tế bào bị kết khối và ít đồng nhất so với khi sử dụng 3 g tế bào (dịch huyền phù tế bào có màu vàng đậm và đồng nhất).

Bảng 2. Ảnh hưởng của cỡ mẫu nuôi cấy lên sự sinh trưởng của tế bào nuôi cấy huyền phù

TG	2 g tế bào			3 g tế bào			4 g tế bào		
	Fw	Dw	Rb1 (mAU ²)	Fw	Dw	Rb1 (mAU ²)	Fw	Dw	Rb1 (mAU ²)
18	3,12	0,16	38.163	4,93	0,24	51.312	5,34	0,28	40.403
20	3,39	0,23	37.859	5,37	0,29	32.509	4,66	0,21	26.514

Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở $p < 0,05$ (Duncan's test). TG: thời gian nuôi cấy (ngày); Fw: khối lượng tươi (g); Dw: khối lượng khô (g).

Nhìn chung, việc xác định cỡ mẫu nuôi cấy ban đầu là rất cần thiết cho quá trình sinh trưởng của tế bào trong nuôi cấy huyền phù. Khi mật độ tế bào trong bình nuôi cấy quá cao hoặc quá thấp đều làm cho sinh trưởng của tế bào kém đi (Nakagawa *et al.*, 1984). Ảnh hưởng của cỡ mẫu nuôi cấy ban đầu lên sinh trưởng của tế bào nuôi cấy huyền phù đã được khảo sát trên nhiều loài thực vật khác nhau. Gou và Zhang (2005), khi nghiên cứu nuôi cấy huyền phù tế bào cây gừng nhận thấy, nếu lượng mẫu ban đầu thấp hơn 0,5% (w/v) tế bào sinh trưởng chậm, trong khi với lượng mẫu cao hơn 2,0% (w/v) tế bào sẽ sinh trưởng nhanh (Guo, Zhang, 2005).

Đối với hàm lượng Rb1, kết quả phân tích cho thấy ở tất cả các công thức, sự tích lũy Rb1 trong tế bào ở thời điểm 18 ngày đều cao hơn thời điểm 20 ngày, trong đó ở cỡ mẫu 2 g sự chênh lệch không đáng kể (38.163 so với 37.859 mAU²), trong khi với cỡ mẫu 3 và 4, hàm lượng Rb1 ở thời điểm 18 ngày cao gấp khoảng 1,5 lần so với thời điểm 20 ngày.

Từ kết quả khảo sát ảnh hưởng của cỡ mẫu lên sinh trưởng của tế bào Giảo cổ lam cho thấy, tế bào Giảo cổ lam sinh trưởng tốt với cỡ mẫu nuôi cấy ban đầu là 3 g trong bình tam giác thể tích 250 ml, chứa 50 ml môi trường và sau 18 ngày hàm lượng Rb1 sẽ đạt cực đại. Trong các nghiên cứu tiếp theo chúng tôi sử dụng cỡ mẫu nuôi cấy là 3 g và thu hoạch sinh khối sau 18 ngày nuôi cấy để khảo sát ảnh hưởng các điều kiện nuôi cấy khác lên sinh trưởng và tích lũy Rb1 của tế bào Giảo cổ lam.

Ảnh hưởng của tốc độ lắc lên sự sinh trưởng và tích lũy Rb1 của tế bào Giảo cổ lam nuôi cấy huyền phù

Tốc độ lắc là một trong những thông số quan trọng của quá trình nuôi cấy huyền phù tế bào, liên quan đến quá trình trao đổi chất của tế bào. Thông thường, tốc độ lắc 120 vòng/phút cho hiệu quả tốt nhất đối với đa số các trường hợp (Nhan, Loc, 2018; Ramírez-Mosqueda, Iglesias-Andreu, 2017). Sau khi khảo sát thời gian sinh trưởng và cỡ mẫu nuôi cấy ở các thí nghiệm trước, chúng tôi nhận thấy 3 g tế bào là phù hợp, tế bào thu vào ngày thứ 18 của quá trình nuôi cấy sẽ thu được hàm lượng Rb1 cao nhất. Ở thí nghiệm này, các tốc độ lắc khác nhau (100 - 150 vòng/phút) sẽ được sử dụng trong quá trình nuôi cấy, kết quả sinh trưởng của tế bào sau 18 ngày nuôi cấy được trình bày ở bảng 3. Trong thí nghiệm của chúng tôi, tốc độ lắc 120 vòng/phút vẫn cho kết quả tốt nhất, các tốc độ lắc cao hơn hay thấp hơn đều không cho kết quả tốt bằng.

Bảng 3. Ảnh hưởng của tốc độ lắc lên sự sinh trưởng của tế bào nuôi cấy huyền phù

Tốc độ lắc (vòng/phút)	Fw	Dw	Rb1 (mAU ²)
100	3,46 ^c	0,16 ^b	43.014
120	4,93 ^a	0,24 ^a	51.312
150	4,50 ^b	0,17 ^b	34.385

Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở $p < 0,05$ (Duncan's test). Fw: khối lượng tươi (g); Dw: khối lượng khô (g).

KẾT LUẬN

Môi trường MS có bổ sung 3% sucrose, 2,0 mg/L KIN và 0,5 mg/L IBA với cỡ mẫu nuôi cấy ban đầu 3 g callus, tốc độ lắc 120 vòng/phút là thích hợp nhất cho sinh trưởng của tế bào Giảo cổ lam nuôi cấy huyền phù; sinh khối tế bào cao nhất sau 20 ngày nuôi cấy là 5,37 g tươi (0,29 g khô), gấp 1,79 lần so với sinh khối tế bào đưa vào ban đầu. Sau 18 ngày nuôi cấy, hàm lượng Rb1 tích lũy cao nhất, đạt diện tích peak là 51.312 mAU².

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện bằng kinh phí của đề tài cấp Bộ Giáo dục và Đào tạo năm 2019 - 2021, mã số B2019-DHH-562-09.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Nguyễn Hoàng Lộc (2011), *Nuôi cấy mô và tế bào thực vật-Các khái niệm và ứng dụng*. NXB Đại học Huế.
- Bùi Đình Lâm, Nguyễn Thị Tình, Nguyễn Văn Duy, Nguyễn Văn Bảo, Lê Văn Hiền, Ngô Xuân Bình (2015) Nghiên cứu khả năng nhân giống cây Giảo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum* Thunb) bằng phương pháp *in vitro*. *TC Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn* 15: 249-256.
- Chen JC, Tsai CC, Chen LD, Chen HH, Wang WC (2000) Therapeutic effect of gypenoside on chronic liver injury and fibrosis induced by CCl₄ in rats. *Am J Chin Med* 28(2): 175-185.
- Guo Y, Zhang Z (2005) Establishment and plant regeneration of somatic embryogenic cell suspension cultures of the *Zingiber officinale* Rosc. *Scientia Horticulturae* 107(1): 90-96.
- Liu F, Ren D, Guo D-a, Pan Y, Zhang H, Hu P (2008) Method Development for Gypenosides Fingerprint by High Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection and the Addition of Internal Standard. *Chem Pharm Bull* 56(3): 389-393.
- Ma Y-C, Zhu J, Benkrima L, Luo M, Sun L, Sain S, Kont K, Plaut-Carcasson YY (1996) A Comparative Evaluation of Ginsenosides in Commercial Ginseng Products and Tissue Culture Samples Using HPLC. *J Herbs, Spice Med Plant* 3(4): 41-50.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15(3): 473-497.
- Nakagawa K, Konagai A, Fukui H, Tabata M (1984) Release and crystallization of berberine in the liquid medium of *Thalictrum minus* cell suspension cultures. *Plant Cell Rep* 3(6): 254-257.
- Nhan NH, Loc NH (2018) Enhancement of eurycomanone biosynthesis in cell culture of longjack (*Eurycoma longifolia*) by elicitor treatment. *J Plant Biotechnol* 45(4): 340-346.
- Ramírez-Mosqueda MA, Iglesias-Andreu LG (2017) Vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks.) cell suspension cultures: establishment, characterization, and applications. *3 Biotech* 7(4): 242-242.
- Wu Q, Jang M, Piao XL (2014) Determination by UPLC-MS of four dammarane-type saponins from heat-processed *Gynostemma pentaphyllum*. *Biosci Biotechnol Biochem* 78(2): 311-316.

AFFECT OF CULTURE CONDITIONS ON GROWTH AND ACCUMULATION OF SAPONIN RB1 IN *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino SUSPENSION CELLS

Tran Thi Ngoc Anh^{1,2}, Pham Thi Diem Thi¹, Tran Thuy Lan¹, Tran Quoc Dung³, Nguyen Quang Hoang Vu¹, Truong Thi Bich Phuong², Hoang Tan Quang^{1*}

¹ Institute of Biotechnology, Hue University

² University of Sciences, Hue University

³ University of Education, Hue University

SUMMARY

In Vietnam, jaogulan (*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino) is distributed mainly in some mountainous provinces such as Lao Cai, Ha Giang, Cao Bang, Lang Son, Quang Ninh and Hoa Binh. This is a medicinal plant belong to *Curcubitace* family, containing a number of compounds such as saponins, flavonoids, polysaccharides, vitamins and amino acids that beneficial to health. In traditional medicine, jaogulan is used as a medicinal plant to treatment diseases such as high blood pressure, chronic bronchitis, chronic stomach pain. In this study, *in vitro*

jaogulan cells were used as materials to study the effect of culture conditions on the growth and accumulation of Rb1 in the suspension cells. Suspension cells were cultured on basic MS medium supplemented with 3.0% sucrose, 2.0 mg/L KIN and 0.5 mg/L IBA with different initial inoculum sizes (2-4 g) and shaking speed (100 - 150 rpm) for 10 - 24 days of culture. The results of the study showed that the inoculum size was 3 g of callus and the shaking speed of 120 rpm was obtained. The highest cell biomass reached 5.37 g of fresh weight, 0.29 g of dry weight and the growth index was 1.79 after 20 days of culture. The Rb1 accumulation is highest after 18 days of culture, with a peak area of 51,312 mAU².

Keywords: *Gynostemma pentaphyllum*, saponin Rb1, suspension cells, shaking speed.